



06-13-08

150
3628

Attorney Docket No.: HERR 18.313 (100700-09144)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Inventor : Rosa Perez Gomariz, et al.
Serial No. : 09/762,283
Filed : March 28, 2001
Title : METHOD FOR TREATING ENDOTOXIC SHOCK AND ...
Confirmation No. : 3628
Group Art Unit : 1644

June 11, 2008

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

PRIORITY CLAIM AND
SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS

S I R:

Applicant hereby submits a certified copy of **Spanish** patent applications **P 9901235** filed **June 4, 1999**, in order to perfect the claim of priority under 35 USC 119 made in submission to the U.S. Patent and Trademark Office on **March 28, 2001**.

Respectfully submitted,

Hassan A. Shakir
Reg. No. 53,92

Customer Number: 026304
Docket No.: HERR 18.313 (100700-09144)

11183504.99

Filed by Express Mail
(Receipt No. EV 88 78848)
on 06/11/08
pursuant to 37 C.F.R. 1.10.
by [Signature]

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Ramón de Santillán, 15
Telf.: 91 458 61 41 - MADRID

VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Patricia Koch Moreno of Herrero & Asociados, S.L., Alcalá 35, 28014 Madrid, Spain, hereby declare that I am conversant with the Spanish and English languages and that I am the translator of the document attached and certify that to the best of my knowledge and belief the following is a true and correct English translation of the document (Spanish Patent Application Nº 2 160 495)

Dated this 6th day of May 2008



Patricia Koch Moreno

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Ramón de Santillán, 15
Telf.: 91 458 61 41 - MADRID

CERTIFICADO OFICIAL

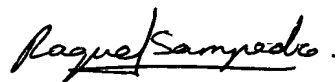
Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE DE INVENCION número P 9901235, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 1999-06-04.

INDICACIÓN DE PRIORIDAD: El código del país con el número de su solicitud de prioridad, que ha de utilizarse para la presentación de solicitudes en otros países en virtud del Convenio de París, es: ES 9901235.

Madrid, 30 de Mayo de 2008

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica

P.D.



RAQUEL SAMPEDRO CALLE



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y
MARCAS

INSTANCIA DE SOLICITUD DE:

NUMERO DE SOLICITUD

P9901235

FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN O.E.P.M.

FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(3) LUGAR DE PRESENTACION CODIGO

MADRID

ES

(1)

☒ SOLICITUD DE ADICION

☐ SOLICITUD DIVISIONAL

☐ CAMBIO DE MODALIDAD

☐ TRANSFORMACION SOLICITUD
EUROPEA

(2) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN

MODALIDAD **PATENTE**

NUMERO SOLICITUD **9800814**

FECHA SOLICITUD **17 ABR 98**

MODALIDAD

NUMERO SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

(4) SOLICITANTES(S)

APELLIDOS O DENOMINACION JURIDICA

NOMBRE

DNI

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

EXENTO DE PAGO DE TASAS
(art. 53 de la Ley Orgánica
11/1983 de Reforma Universitaria)

Q2818014I

(5) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE

DOMICILIO **RECTORADO-AVENIDA DE SENECA, 2**

LOCALIDAD **MADRID**

PROVINCIA **MADRID**

PAIS RESIDENCIA **ES**

NACIONALIDAD **ES**

TELEFONO

91 394 63 74

CODIGO POSTAL

28040

CODIGO PAIS

ES

CODIGO NACION

ES

(6) INVENTORES

(7)

☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO EL INVENTOR O UNICO INVENTOR

(8) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO

☒ INVENC. LABORAL ☐ CONTRATO ☐ SUCESION

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

COD. NACION

PEREZ GOMARIZ

LECETA MARTINEZ

ROSA

JAVIER

ES

ES

ES

ES

(9) TITULO DE LA INVENCION

Composición y método para el tratamiento del shock endotóxico y enfermedades inflamatorias y autoinmunes en mamíferos.

(10) INVENCION REFERENTE A PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO SEGUN ART. 25.2 L.P.

☐ SI

☐ NO

(11) EXPOSICIONES OFICIALES

LUGAR

FECHA

(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD

PAIS DE ORIGEN

COD. PAIS

NUMERO

FECHA

(13) EL SOLICITANTE SE ACOGE A LA EXENCION DE PAGO DE TASAS PREVISTA EN EL ART. 162 L.P.

☐ SI

☐ NO

(14) REPRESENTANTE

APELLIDOS

NOMBRE

CODIGO

DOMICILIO

LOCALIDAD

PROVINCIA

COD. POSTAL

(15) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN

☐ DESCRIPCION. Nº DE PAGINAS.....

☐ REIVINDICACIONES. Nº DE PAGINAS.

☐ DIBUJOS. Nº DE PAGINAS.....

☐ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE
PRIORIDAD

☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACION

☐ PRUEBAS

☐ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS

☐ HOJA DE INFORMACIONES

☐ COMPLEMENTARIAS

☐ OTROS

FIRMA DEL FUNCIONARIO

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

(16) NOTIFICACION DE PAGO DE LA TASA DE CONCESION

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 10-10-86.

José Luis Sotelo Sancho

Vicerector de Investigación

1. O.E.P.M. Expediente

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

UNE A-4 MOD. 3101i

ESPAÑOLA DE PATENTES

OFICINA



Y MARCAS

DATOS DE PRIORIDAD

(31) NUMERO

(32) FECHA

(33) PAIS

A1

(12) PATENTE DE INVENCION

(21) NUMERO DE SOLICITUD

9901235

(22) FECHA DE PRESENTACION

4 JUNIO 1999

(71) SOLICITANTE (S)

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

NACIONALIDAD

ES

DOMICILIO RECTORADO. AVENIDA DE SENECA, 2

MADRID

28040

MADRID

(72) INVENTOR (ES) PEREZ GOMARIZ

LECETA MARTINEZ

DELGADO MORA

JAVIER

MARIO

ROSA

MARTINEZ MORA

CARMEN

(73) TITULAR (ES)

(11) N.º DE PUBLICACION

(45) FECHA DE PUBLICACION

(62) PATENTE DE LA QUE ES
DIVISIONARIA

GRAFICO (SOLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

(51) Int. Cl.⁷ A61K 38/22, A61P 37/02

(54) TITULO

Uso de los péptidos VIP y PACAP para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes en mamíferos.

(57) RESUMEN (APORTACION VOLUNTARIA, SIN VALOR JURIDICO)

Uso de los péptidos VIP y PACAP para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes en mamíferos.
Uso de los péptidos VIP (Péptido intestinal vasoactivo) y PACAP (Péptido inhibidor de la adelinato ciclase hipofisaria) y de sus fragmentos y derivados, en la preparación de fármacos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes en mamíferos. Estos preparados inhiben la producción de citoquinas proinflamatorias y la activación de células Th1, estimulando la activación de células Th2.

TÍTULO

Uso de los péptidos VIP y PACAP para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes en mamíferos.

5

ESTADO DE LA TECNICA

Los procesos inflamatorios son un proceso vital para la supervivencia de todos los organismos complejos. De forma natural la inflamación es un proceso de defensa del organismo frente a un agente extraño. La acumulación y activación de leucocitos en los lugares donde se produce la agresión es un acontecimiento central en todo proceso inflamatorio (Schaal TJ y Bacon KB; Current Opinion in Immunology 1994, 6:865). Una respuesta inflamatoria insuficiente puede comprometer la supervivencia del organismo, pero una respuesta excesiva, que puede deberse a fallos en los mecanismos de desactivación del proceso por distintas causas, puede terminar desencadenando una enfermedad inflamatoria o autoinmune (Sacca R y col.; Current Opinion in Immunology 1997, 9:851). Estas enfermedades son una causa importante de morbilidad y mortalidad en los mamíferos por los daños tisulares asociados a dichos procesos.

Los macrófagos juegan un papel central en la regulación de las respuestas inmunes e inflamatorias. La ejecución de estas actividades está mediada por toda una serie de procesos complejos en los que intervienen, entre otros, muchos productos de origen macrofágico. Como respuesta a los antígenos, y según su origen, los macrófagos secretan citoquinas proinflamatorias y agentes oxidantes, tales como $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β , IL-12 y óxido nítrico (Laskin DL y col.; Annual Review of Pharmacology and Toxicology 1995, 35:655). $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 son, entre otros, dos factores que contribuyen a los cambios fisiopatológicos asociados con varios estados de inflamación crónica o aguda. Los macrófagos, además, participan en el inicio, mantenimiento y control de las respuestas inmunes, actuando como potentes presentadores de antígenos,

proporcionando a los linfocitos T una doble señal de activación: el complejo antígeno-moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y una señal coestimuladora mediada por moléculas de la familia B7 (Lenschow DJ y col.; Annual Review of Immunology 1996, 14:233). Las moléculas B7 comprenden dos isoformas, B7.1 y B7.2, cada una de ellas implicada en la estimulación de dos tipos de células T colaboradoras (Th) distintas, Th1 y Th2 respectivamente, y cada una de ellas produce un conjunto de citoquinas distintas (Kuchroo VK y col.; Cell 1995, 80:707).

La activación de las células Th1 implica la producción, entre otros factores, de IFN γ e IL-12, está asociada a la producción de anticuerpos de isotipo IgG2a y se manifiesta como una reacción de tipo inflamatorio retardado. La activación de células Th2 implica la producción de IL-4, IL-5 e IL-10 entre otros factores, está asociado a la secreción de anticuerpos de isotipo IgG1, inhibe la respuesta inflamatoria retardada y se manifiesta como una respuesta humoral (Constant SL y Bottomly K; Annual Review of Immunology 1997, 15:297). Los factores que determinan la diferenciación de uno u otro tipo de respuesta son, principalmente, las características de las células presentadoras de antígenos y las citoquinas presentes en el microambiente en el que se desarrolla la respuesta: IL-12 determina la diferenciación de células Th1 mientras que IL-4 lo hace de Th2. Cuando ambas están presentes predomina el efecto de IL-4 (O'Garra AO; Immunity 1998, 8:275). Numerosos casos de enfermedades inflamatorias y autoinmunes se deben a la activación de un tipo de células Th inadecuado. Enfermedades tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, reacción injerto contra huesped y otras, se caracterizan por una activación de las células Th1.

El Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) es un péptido básico de 28 aminoácidos cuya secuencia es (Mutt V y Said SI; European Biochemistry 1974, 42:581):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH₂

Se aisló en primer lugar a partir de intestino delgado porcino y posteriormente se identificó en el cerebro y en terminaciones nerviosas del sistema periférico, estableciéndose su naturaleza como neuropéptido con propiedades neuromoduladoras (Fahrenkrug J; *Pharmacology and Toxicology* 1993, 72:354). Su nombre se debe a sus propiedades vasodilatadoras periféricas. También se ha identificado VIP en células cebadas de rata y en granulomas (Cutz E. y col.; *Nature* 1978, 275:661). Estudios inmunoquímicos realizados en secciones histológicas de timo, bazo y ganglios linfáticos de rata han identificado VIP inmunoreactivo en linfocitos de estos órganos (Gomariz RP y col.; *Annals of the New York Academy of Sciences* 1992, 650:13; Leceta y col.; *Advances in Neuroimmunology* 1996, 6:29).

El VIP ejerce sus efectos biológicos a través de receptores de membrana pertenecientes a la superfamilia de siete dominios hidrofóbicos acoplados a proteínas G, las cuales transducen la información hasta las moléculas efectoras finales (Laburthe M y Couvineau A; *Annals of the New York Academy of Sciences* 1988, 527:296). Los receptores para VIP han sido caracterizados en numerosos tejidos como hígado y tejido adiposo entre otros y que corresponden a dos tipos, los llamados VIP1-R (Ishihara T y col.; *Neuron* 1992, 8:811) y VIP2-R (Lutz E. y col.; *FEBS Letters* 1993, 334:3). En el sistema inmune se han caracterizado receptores específicos para VIP en una variedad de células inmunes que incluyen linfocitos periféricos humanos, monocitos humanos, linfocitos de rata y de ratón, macrófagos alveolares de rata y macrófagos peritoneales de rata y ratón (Gomariz RP y col.; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994, 203:1599; Delgado M y col.; *Regulatory Peptides* 1996, 62:161). El VIP modula una gran variedad de funciones inmunes como son la función fagocítica, en cada una de las etapas del proceso, la respuesta proliferativa, la producción de inmunoglobulinas, la actividad NK y la producción de citoquinas (De La Fuente M y col.; *Advances in Neuroimmunology* 1996, 6:75).

El péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) es un miembro de la familia de péptidos de la secretina/VIP/glucagon del que se conocen dos formas moleculares PACAP-38 y PACAP-27, cuyas secuencias son respectivamente (Ogi K y col.; Biochemical and Biophysical Research communication 1993, 196:1511):

5

PACAP-38

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Thy-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys-NH₂

10

PACAP-27

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Thy-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-NH₂

15 Ambos péptidos están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y periférico.

También hay células productoras de PACAP en pulmón, células B pancreáticas e intestino (Arimura A; Regulatory Peptides 1992, 37:287). En el sistema inmune se ha descrito una gran abundancia de células positivas para PACAP en órganos linfoides
20 centrales y periféricos (Gaytan F y col.; Cell and Tissue Research 1994, 276:233). Para el PACAP se han descrito tres tipos de receptores (Shivers BD y col.; Endocrinology 1991, 128:3055; Inagaki N y col.; Proceeding of the National Academy of Sciences USA 1994, 91:2679) : el receptor de PACAP tipo I (PACAP-R-I) con igual afinidad para el PACAP-38 y el PACAP-27, pero que posee una afinidad de 300 a 1000 veces menor por
25 el VIP ; el receptor de PACAP tipo II (PACAP-R-II) que reconoce con la misma afinidad al VIP, PACAP-38 y PACAP-27 por lo que se le denomina receptor común de VIP-PACAP y corresponde al receptor de VIP VIP1-R, y el receptor de PACAP tipo III (PACAP-R-III) que corresponde al receptor de VIP VIP2-R. Hasta el momento, son escasos los estudios sobre las acciones biológicas del PACAP en el sistema inmune. Los

efectos del PACAP son en muchos casos similares a los del VIP modulando la función fagocítica y las respuestas proliferativas.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

5

El objeto de esta invención es desarrollar preparados de VIP, PACAP y análogos como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

El tratamiento consiste en la administración a mamíferos, que lo necesiten, de una cantidad efectiva de un agente inhibidor de la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) o de IL-6 en un vehículo farmacéuticamente aceptable, o bien la administración a mamíferos, que lo necesiten, de una cantidad efectiva de un agente que aumente la producción de IL-4, inhibiendo la activación de células Th1 y estimulando la activación de células Th2. Estos agentes son VIP, PACAP o alguno de sus fragmentos activos.

15

El factor de necrosis tumoral (TNF) es producido por varios tipos celulares que incluyen monocitos y macrófagos, linfocitos T y B, neutrófilos, células cebadas, células tumorales y fibroblastos. Es un importante factor regulador de otras citocinas pro-inflamatorias, como son IL-1 β , IL-6 e IL-8. El TNF α induce la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, activa a los leucocitos para que destruyan los microorganismos, actúa sobre los hepatocitos para aumentar la síntesis de proteínas séricas que contribuyen a la respuesta de fase aguda y activa el sistema de coagulación. Su sobreproducción conduce a enfermedades inmunopatológicas, autoinmunidad e inflamación.

20

25

La IL-6 es una citoquina multifuncional producida tanto por linfocitos como por células no linfoides. Regula varios aspectos de la respuesta inmune, como la producción de

proteínas que median la fase aguda y la hematopoyesis. Además actúa como mediador en la respuesta inflamatoria. Su producción está regulada por varios factores, que incluyen $\text{TNF}\alpha$, IL-1 y endotoxina bacteriana (LPS).

- 5 La IL-4 es una citoquina que inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias, promueve la proliferación y diferenciación de linfocitos B activados y aumenta la expresión de moléculas MHC de tipo II en linfocitos B. Se ha puesto de relieve su posible utilización clínica en tratamientos antiinflamatorios y enfermedades autoinmunes.

10

- Se han ensayado estrategias de neutralización de citoquinas proinflamatorias en el tratamiento de enfermedades inflamatorias pero los resultados no muestran que se produzca una mejoría a largo plazo. La administración de VIP y PACAP en modelos animales consigue estos efectos y nuestro invento consiste en la utilización de un
- 15 tratamiento con estos neuropéptidos para revertir estados inflamatorios patológicos y enfermedades autoinmunes.

- El VIP y el PACAP tienen efectos antiinflamatorios e inhiben la producción de IL-6 y $\text{TNF}\alpha$. Además VIP y PACAP modulan la capacidad de las células presentadoras de
- 20 antígenos para actuar induciendo la activación proliferación y diferenciación de linfocitos con un patrón de secreción de citoquinas típico de las células Th2 y condicionan las respuestas inmunes "in vivo" favoreciendo el desarrollo de respuestas de tipo humoral e inhibiendo respuestas de tipo celular.

25 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 representa la producción de $\text{TNF}\alpha$ por parte de macrófagos murinos en cultivo (5×10^5 células/ml) estimuladas con 10ng/ml de LPS en presencia o ausencia de 10^{-8}M de VIP o PACAP a lo largo de 24 horas.

La Figura 2 representa la producción de $\text{TNF}\alpha$ por parte de macrófagos murinos en cultivo (5×10^5 células/ml) después de 6 horas en cultivo con 10ng/ml de LPS y a los que se añadió, a distintos tiempos, 10^{-8}M de VIP o PACAP.

- 5 La Figura 3 representa la producción de IL-6 por parte de macrófagos murinos en cultivo (5×10^5 células/ml) estimuladas con 10ng/ml de LPS en presencia o ausencia de 10^{-8}M de VIP o PACAP a lo largo de 24 horas.

10 La Figura 4 representa la producción de IL-6 por parte de macrófagos murinos en cultivo (5×10^5 células/ml) después de 6 horas en cultivo con 10ng/ml de LPS y a los que se añadió, a distintos tiempos, 10^{-8}M de VIP o PACAP.

La Figura 5 presenta el análisis por Northern blot para la presencia de mRNA de $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 en macrófagos estimulados con LPS en presencia o ausencia de VIP o PACAP
15 (18S representa el correspondiente rRNA como control de la cantidad total de RNA cargada).

La Figura 6 representa la supervivencia de ratones inyectados con 400 $\mu\text{gr.}$ de LPS y simultáneamente o a los 30 minutos, 1 o 4 horas con 5nmol. de VIP o PACAP.

20 A. Control; B: VIP a 0h.; C: VIP a 0,5 h.; D: VIP a 1 h.; E: VIP a 4 h.

La Figura 7 representa el número de células secretoras de IL-4 en bazo y peritoneo detectadas mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción en placa conjugado con enzima (ELISPOT) en ratones inmunizados en las condiciones especificadas en el
25 Ejemplo 7 y que simultáneamente a la segunda inyección del antígeno recibieron 5nmol de VIP o PACAP o una inyección de solución salina.

La Figura 8 representa la cantidad de inmunoglobulinas anti-hemocianina de caracol (anti-KLH) de los isotipos IgG2a e IgG1 detectables en suero mediante la técnica de

ensayo por inmunoabsorción conjugado con enzima (ELISA) en ratones inmunizados en las condiciones especificadas en el Ejemplo 8 y tomadas las muestras de suero dos semanas después de la última inyección.

- 5 La Figura 9 representa el número de células productoras de IL-4 detectadas mediante la técnica de ELISPOT en ratones que fueron inmunizados en las condiciones especificadas en los Ejemplos 7 y 8 y que en la segunda inyección recibieron o no 5nmol de VIP junto con 100µgr de IgG, anti-B7.1 o anti-B7.2.

10

MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION

Los ejemplos que siguen son solo para ilustrar los resultados conseguidos y no limitan la utilización del invento que se detallan en las reivindicaciones especificadas.

15

EJEMPLO 1

VIP y PACAP inhiben la producción de TNF α en macrófagos estimulados con LPS

- 20 En experimentos realizados "in vitro" VIP y PACAP inhiben la producción de TNF α en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. El mayor grado de inhibición alcanza valores cercanos al 60% y se produce con dosis de estimulación entre 1-10 ngr./ml de LPS. La IC₅₀ es de unos 80 pM, tanto para VIP como para PACAP y su efecto se observó hasta el final del experimento (ver Figura 1). El efecto inhibitor es el mismo si ambos neuropéptidos se añaden hasta 1 hora después de estimular los
- 25 macrófagos con LPS, aunque disminuye progresivamente hasta desaparecer si se añaden después de 4 horas (ver Figura 2).

30

EJEMPLO 2

VIP y PACAP reducen los niveles circulantes de TNF α después de la inyección de LPS

- 5 En un experimento realizado con ratones los niveles circulantes de TNF α 2 horas después de la inyección de 25 μ gr. de LPS se aproximaron a los 4 ngr./ml. La administración simultánea de 5nmol de VIP o PACAP redujeron dichos niveles un 60%.

EJEMPLO 3

10

VIP y PACAP inhiben la producción de IL-6 en macrófagos estimulados con LPS

- En experimentos realizados “in vitro” VIP y PACAP inhiben la producción de IL-6 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. El mayor grado de inhibición
15 alcanza valores cercanos al 90% y se produce con dosis de estimulación de 10 μ gr./ml de LPS. La IC₅₀ es de 8.6 pM, tanto para VIP como para PACAP y su efecto se observó hasta el final del experimento (ver Figura 3). El efecto inhibitor también se observa si los neuropéptidos se añaden después de la estimulación con LPS, aunque el grado de inhibición es progresivamente menor (ver Figura 4).

20

EJEMPLO 4

VIP y PACAP reducen los niveles circulantes de IL-6 después de la inyección de LPS

- 25 En un experimento realizado con ratones los niveles circulantes de IL-6 dos horas después de la inyección de 25 μ gr. de LPS se aproximaron a 1.5 ngr./ml. La administración simultánea de 5nmol de VIP o PACAP redujeron dichos niveles un 60% y un 75% respectivamente.

EJEMPLO 5

VIP Y PACAP regulan la producción de TNF α e IL-6 a nivel transcriptional

- 5 Se sometieron macrófagos de ratón a las condiciones experimentales de los ejemplos 1 y 3 y se aisló su mRNA, que después se analizó mediante Northern blot para detectar mRNA de TNF α e IL-6. La Figura 5 muestra la ausencia de transcritos para TNF α o IL-6 cuando los macrófagos activados con LPS son expuestos además a VIP o PACAP.

10 EJEMPLO 6

VIP y PACAP protegen de los efectos letales de LPS

- 15 Se realizó un experimento en el que se estudió la supervivencia a lo largo de un periodo de 4 días en ratones después de inyectarles 400 μ gr. de LPS. Los resultados se reflejan en la Figura 6. La mortalidad en estas circunstancias fue del 100% a las 36 horas. Con la administración simultánea de 5 nmol. de VIP o PACAP se consiguió una supervivencia del 60% al final del experimento. La administración de los neuropeptidos hasta 1 hora después de la inyección de LPS todavía registró tasas de supervivencia cercanas al 50%.

20

EJEMPLO 7

VIP y PACAP aumentan la proporción de células secretoras de IL-4.

- 25 Grupos de ratones fueron inmunizados con 50 μ gr de KLH emulsionados en un adyuvante, repitiéndose la inyección con 100 μ gr de KLH dos semanas después e inyectando simultáneamente 5 nmol/ratón de VIP, PACAP o solución salina. Dos semanas después de la última inyección se realizaron suspensiones celulares de bazo y peritoneo que fueron cultivadas durante 24 horas en presencia de 50 μ gr/ml de KLH,

tras lo cual se determinó el número de células productoras de IL-4 mediante la técnica de ELISPOT. En los ratones inyectados con VIP o PACAP el número de células productoras de IL-4 aumentó del orden de 20 veces sobre los que no fueron tratados con estos neuropéptidos (ver Figura 7).

5

EJEMPLO 8

VIP y PACAP inducen la producción de anticuerpos del isotipo IgG1.

10 Grupos de ratones fueron inmunizados con 50 μ gr de KLH emulsionados en un adyuvante, repitiéndose la inyección con 100 μ gr de KLH dos semanas después e inyectando simultáneamente 5 nmol/ratón de VIP, PACAP o solución salina. Dos semanas después de la última inyección se determinaron los niveles de anti-KLH y su isotipo mediante ELISA específico para los isotipos IgG1 e IgG2a. En los ratones
15 inyectados con VIP o PACAP los anticuerpos anti-KLH detectables en suero dos semanas después de la última inmunización son solamente del isotipo IgG1, mientras que en los que solamente recibieron solución salina fueron del isotipo IgG2a (ver Figura 8)

20 EJEMPLO 9

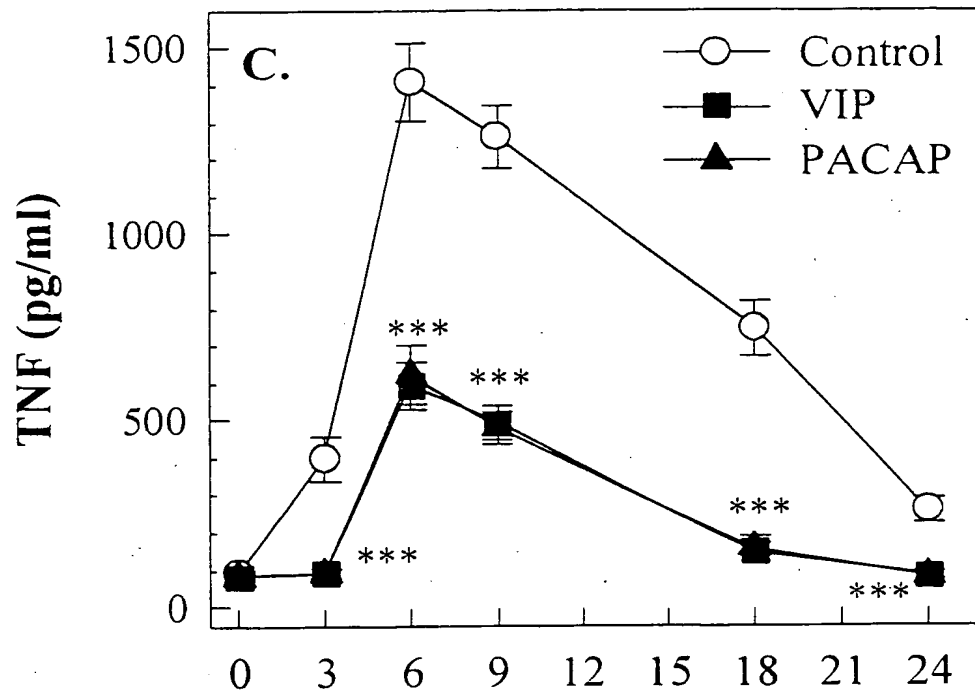
El aumento de la proporción de células productoras de IL-4 mediado por VIP y PACAP está relacionado con la expresión de B7.2 inducida por ambos neuropéptidos.

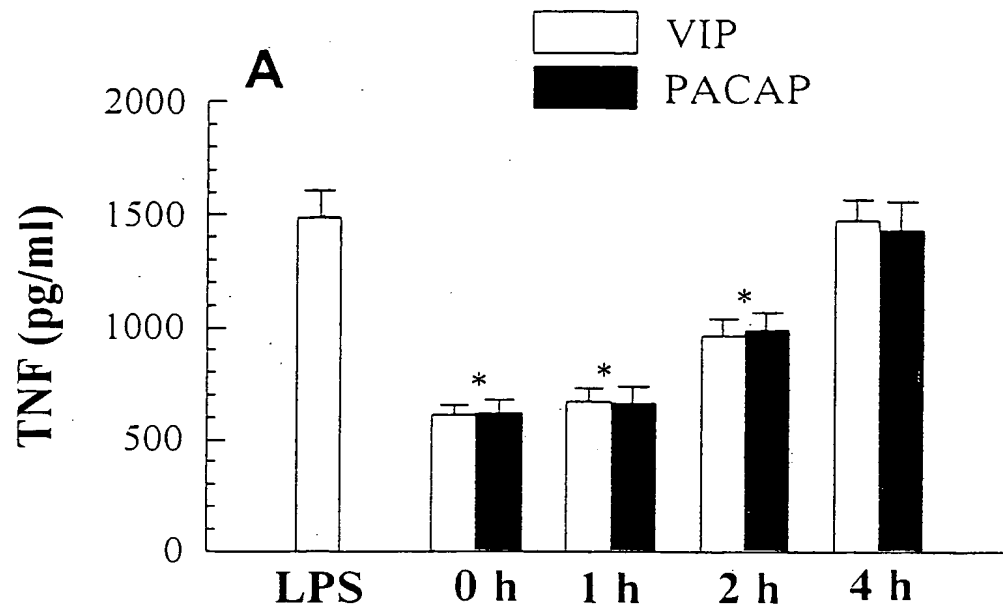
25 Grupos de ratones fueron inmunizados en las mismas condiciones de los Ejemplos 7 y 8, pero en el momento de la segunda inmunización con KLH los ratones que fueron inyectados simultáneamente con VIP o PACAP recibieron al mismo tiempo 100 μ gr de anticuerpo anti-B7.1, anti-B7.2 o la misma cantidad de IgG como control. En los ratones que recibieron anticuerpos anti-B7.2 simultáneamente a la administración de los

neuropéptidos el número de células productoras de IL-4 se redujo a la proporción alcanzada en los animales que no fueron inyectados con los neuropéptidos (ver Figura 9).

REIVINDICACIONES

- 1.- Uso del péptido intestinal vasoactivo (VIP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento de patologías inflamatorias o autoinmunes caracterizadas por la activación de células Th1, tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, reacción injerto contra huesped y otras, debido a su capacidad como agentes inhibidores de las células Th1 y citoquinas proinflamatorias.
- 2.- Uso del péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento de patologías inflamatorias o autoinmunes caracterizadas por la activación de células Th1, tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, reacción injerto contra huesped y otras, debido a su capacidad como agentes inhibidores de las células Th1 y citoquinas proinflamatorias.

**FIGURA 1**

**FIGURA 2**

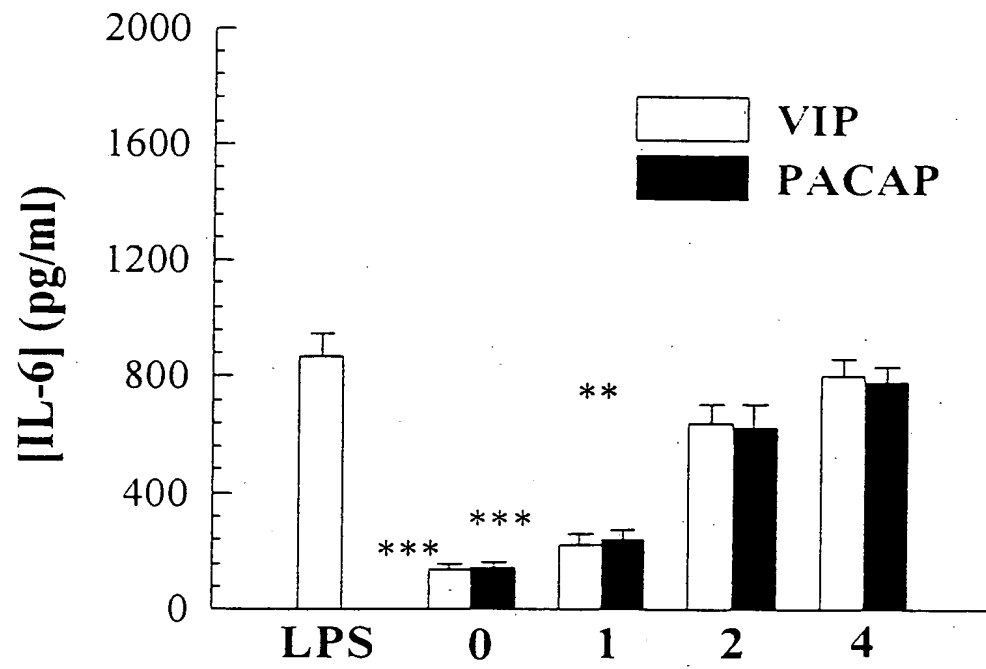


FIGURA 3

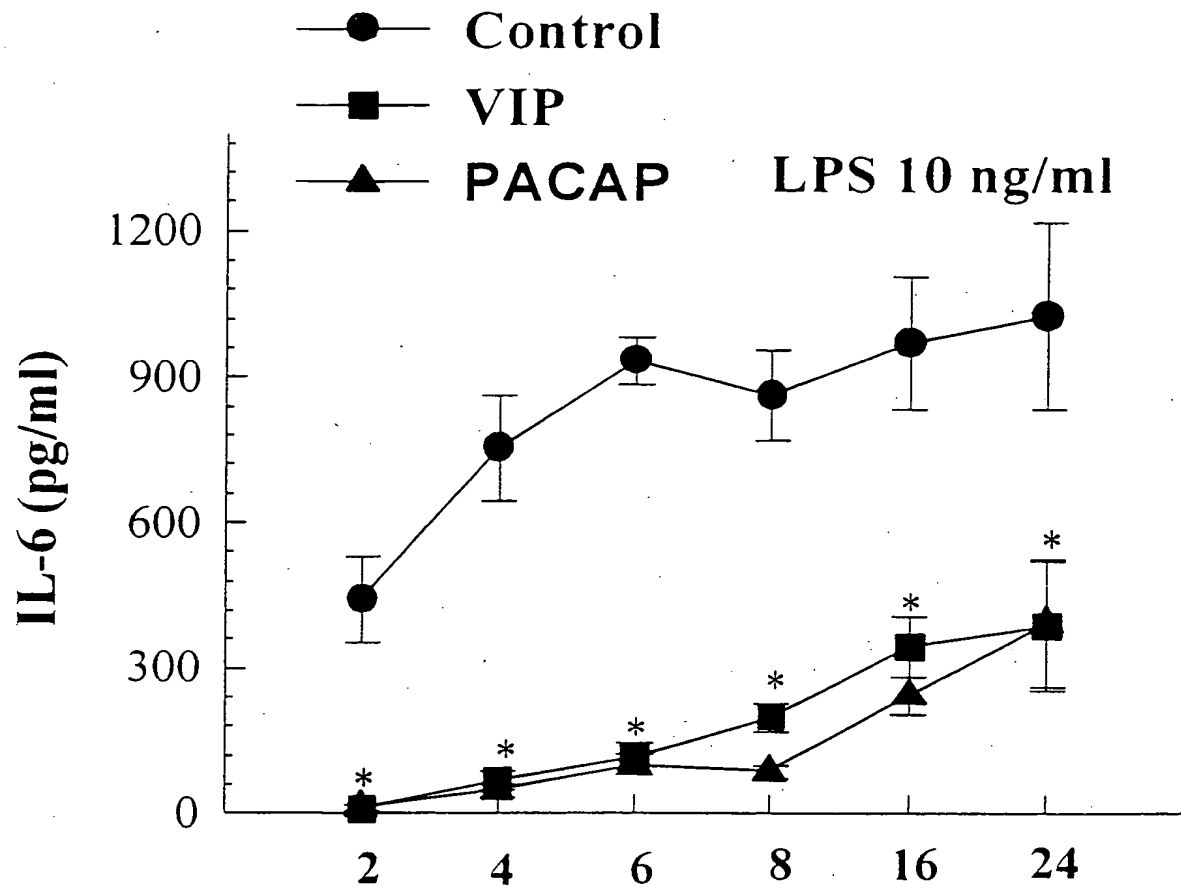


FIGURA 4

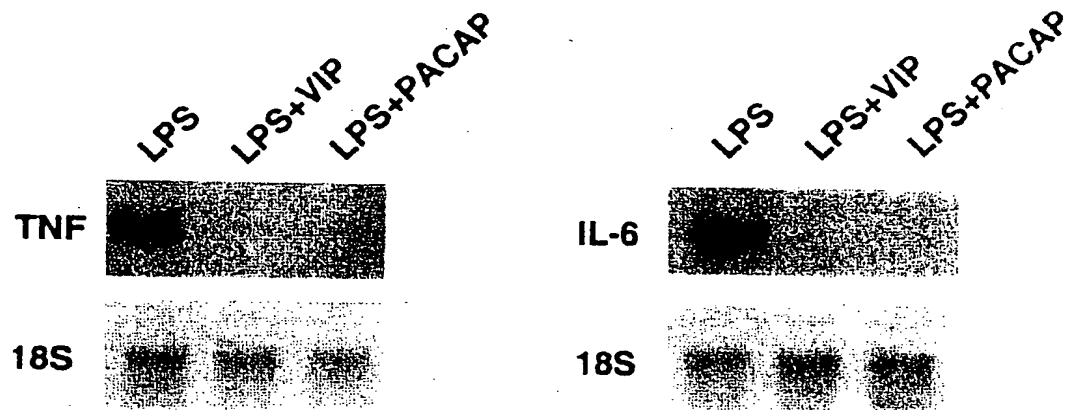


FIGURA 5

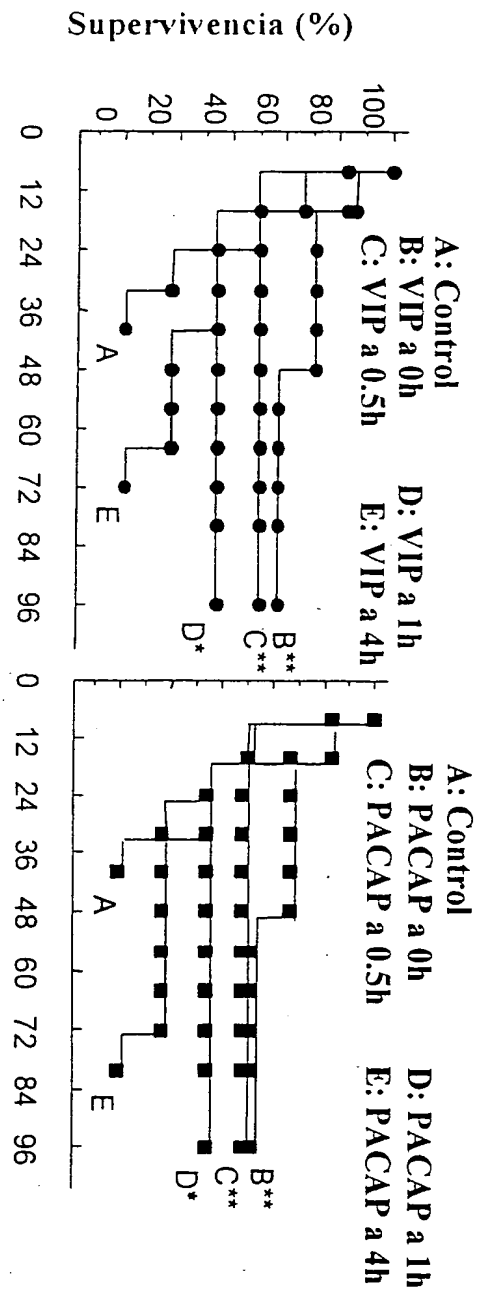


FIGURA 6

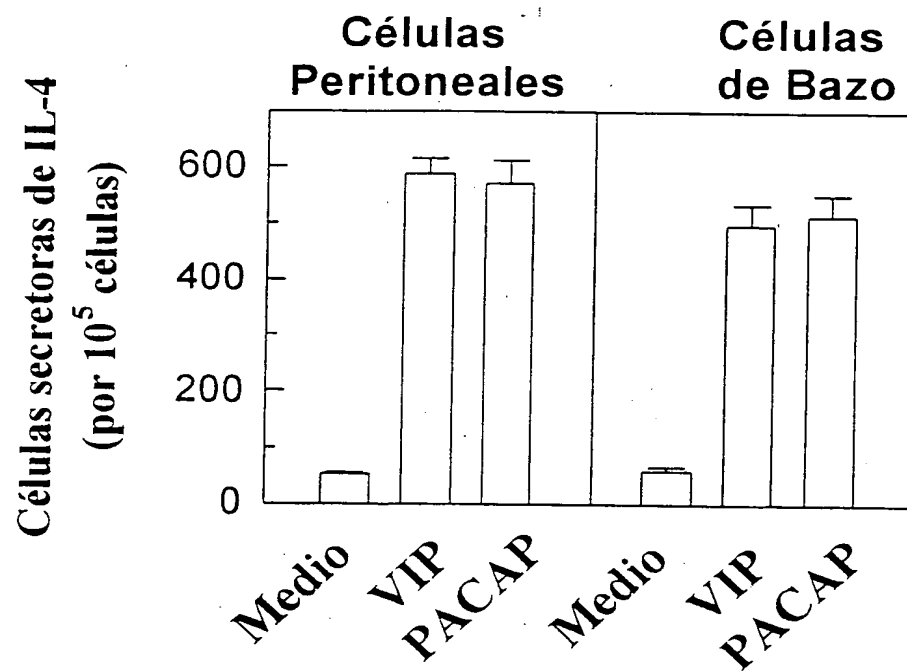


FIGURA 7

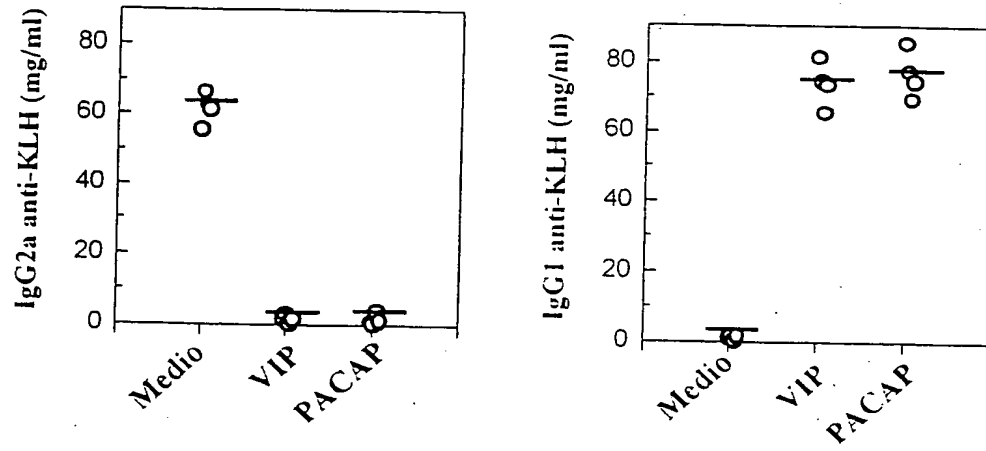


FIGURA 8

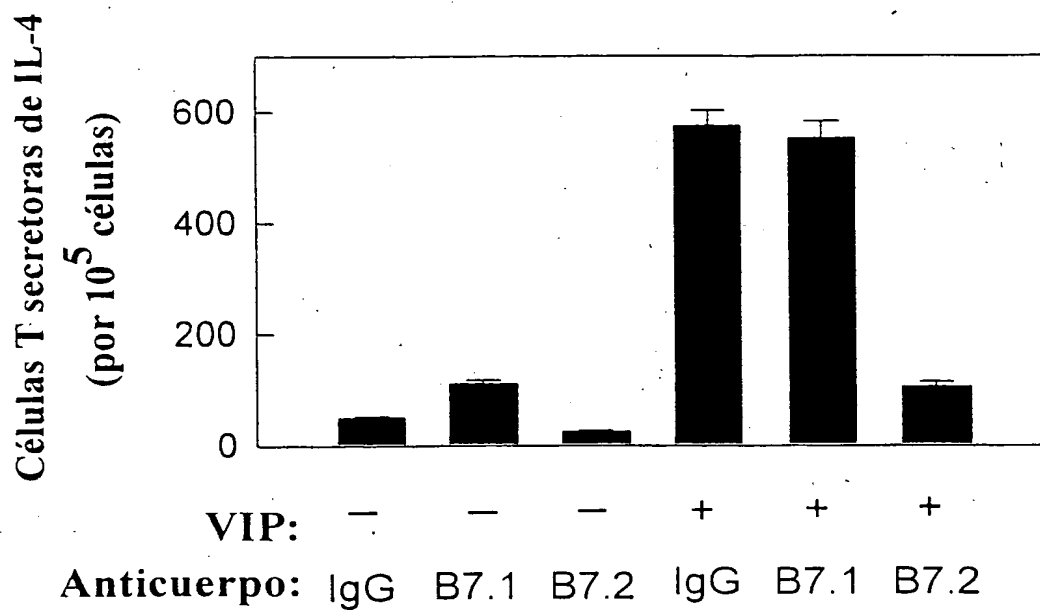


FIGURA 9